COrDIS Plus

Набор реагентов для мультиплексного анализа 19-ти STR-маркеров и локуса амелогенина человека

Инструкция пользователя

Оглавление

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ ____ 2

1.1 Описание продукта ____ 2
1.2 Компоненты набора и состав (на примере кат. ном. CP-192S) ____ 4
1.3 Условия хранения ____ 6
1.4 Основные характеристики набора ____ 6
1.5 Гарантии качества ____ 6
1.6 Сопутствующие материалы ____ 6

2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ ____ 7

2.1 Контрольная ДНК ____ 7
2.2 Размерный стандарт S550 ____ 7
2.3 Аллельная лестница ____ 8

3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ ____ 9

3.1 Постановка реакции ____ 9
3.2 Условия амплификации ____ 9

4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL ____ 11

4.1 Спектральная калибровка ____ 11
4.2 Условия капиллярного электрофореза ____ 13
4.3 Создание Instrument Protocol ____ 14
4.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации ____ 14
4.5 Запуск прибора ____ 15
4.6 Оптимизация интенсивности сигналов ____ 16

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL ____ 16

5.1 Спектральная калибровка ____ 17
5.2 Создание Instrument Protocol ____ 19
5.3 Создание Size Standard ____ 21
5.4 Создание QC Protocol ____ 21
5.5 Создание Assay ____ 22
5.6 Подготовка и загрузка продуктов амплификации ____ 23
5.7 Запуск прибора ____ 24
5.8 Оптимизация интенсивности сигнала ____ 25

6. АНАЛИЗ ДАННЫХ 25

6.1 Настройка программного обеспечения GeneMapper 25
6.2 Размерный стандарт S550 30
6.3 Диапазоны размеров аллелей STR маркеров 31
6.4 Амплификация контрольной ДНК 32
6.5 Аллельная лестница 33

7. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ 34

История изменений:

Версия документа	Дата	Описание	Раздел
231016	16.10.23	Внесены изменения в протокол приготовления раствора аллельной лестницы	Раздел 2. Разведение сухих компонентов, пункт 2.3
230706	06.07.23	Внесены рекомендации по этапу денатурации ПЦР продуктов	Раздел 4. Электрофорез на анализаторе ABI PRISM 3130/3130XL, пункт 4.4; Раздел 5. Электрофорез на анализаторе ABI PRISM 3500/3500XL, пункт 5.6

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОДУКТЕ

1.1 Описание продукта

COrDIS Plus – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 19-ти локусов, содержащих короткие тандемные повторы (STR-локусы) и локуса гена амелогенина в геномной ДНК человека. Из 19-ти анализируемых STR-локусов 13 составляют стандартную панель CODIS (системы комбинированного индекса ДНК: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, и VWA), 5 локусов рекомендованы ENFSI (Европейской Сетью Институтов Криминалистики) для расширения европейских национальных баз данных (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 и D22S1045) и локус SE33 - наиболее полиморфный из известных STR-маркеров. Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 20-ти локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов <420 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом

капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией. В наборе используется пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременной детекции в разных каналах флуоресценции. Праймеры мечены четырьмя флуоресцентными красителями, детектируемыми в каналах *Blue*, *Green*, *Yellow*, *Red*. Размерный стандарт S550 мечен пятым, флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале *Orange* одновременно с продуктами ПЦР.

Для получения полного STR- профиля образца достаточно 0,2 нанограмм не деградированной ДНК. Оптимальное количество – 0,5 нанограмм.

Реакционная смесь в наборе аликвотирована в реакционных стрипованных пробирках 0,2 мл и поставляется в лиофилизированном виде, благодаря чему реакционные смеси могут храниться при комнатной температуре не менее 18 месяцев без потери чувствительности. Компоненты реакции активируются добавлением определенного объема раствора активатора в каждую пробирку. Общий объем реакции **25 мкл**. Максимальный объем вносимого в реакцию раствора ДНК может составлять 20 мкл. Благодаря высокой устойчивости реакционной смеси к действию ингибиторов, большой объем препарата ДНК не мешает успешной амплификации.

Набор COrDIS Plus может использоваться для создания национальных криминалистических баз данных в странах, использующих в качестве стандартной панели локусов маркеры CODIS (Combined DNA Index System), а также Европейских баз данных на основе ESS (European standard set), включая страны, использующие SE33 как обязательный маркер. Благодаря максимальному дискриминирующему потенциалу, COrDIS Plus подходит для ДНК-идентификации личности, анализа родства (например, экспертизы спорного отцовства), а также для анализа химеризма после пересадки костного мозга.

Набор валидирован для проведения ПЦР в амплификаторах: GeneAmp® 9700, GeneAmp® 2720, ProFlex PCR System, Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, SimpliAmp™ Thermal Cycler. Анализ ПЦР-продуктов может проводиться с использованием генетических анализаторов ABI PRISM® 310/3130/3130XL/3500/3500XL (Applied Biosystems) и Нанофор 05 (Синтол).

Таблица 1. Описание STR-локусов COrDIS Plus

Маркер	Реф. номер GenBank®	Реф. аллель GenBank®	Хромосомная локализация	Структура единицы повтора реф. аллеля
D1S1656	NC_000001.9	17	1q42	$[TAGA]_{16}$ [TGA][TAGA][TAGG]$_1$[TG]$_5$
D2S441	AL079112	12	2p14	$[TCTA]_{12}$
D3S1358	NT_005997	18	3p21.31	TCTA $[TCTG]_2$ $[TCTA]_{15}$
D5S818	AC008512	11	5q23.2	$[AGAT]_{11}$
D7S820	AC004848	13	7q21.11	$[GATA]_{13}$
D8S1179	AF216671	13	8q24.13	$[TCTA]_3$
D10S1248	AL391869	13	10q26.3	$[GGAA]_{13}$
D12S391	G08921	19.3	12p13.2	$[AGAT]_5$ GAT$[AGAT]_7$ $[AGAC]_6$ AGAT
D13S317	AL353628	11	13q31.1	$[TATC]_{11}$
D16S539	AC024591	11	16q24.1	$[GATA]_{11}$
D18S51	AP001534	18	18q21.33	$[AGAA]_{18}$
D21S11	AP000433	29	21q21.1	$[TCTA]_4[TCTG]_6$ $[TCTA]_3$TA$[TCTA]_3$ TCA $[TCTA]_2$TCCATA $[TCTA]_{11}$
D22S1045	AL022314	17	22q12.3	$[ATT]_{14}$ ACT $[ATT]_2$
CSF1PO	X14720	12	5q33.1	$[AGAT]_{12}$
FGA	M64982	21	4q31.3	$[TTTC]_3$ TTTTTTCT$[CTTT]_{13}$ CTCC$[TTCC]_2$
SE33	V00481	26.2	6q14	$[AAAG]_8$ AA $[AAAG]_{17}$
TH01	D00269	9	11p15.5	$[TCAT]_9$
TPOX	M68651	11	2p25.3	$[AATG]_{11}$
VWA	M25858	18	12p13.31	TCTA $[TCTG]_4$ $[TCTA]_{13}$
Амелогенин X	M55418	X	Xp22.1-22.3	
Амелогенин Y	M55419	Y	Yp11.2	

Таблица 1 Сводная информация о STR-локусах набора COrDIS Plus. Структура единицы повтора приводится в соответствии с рекомендациями Международного Общества Судебных Генетиков (International Society for Forensic Genetics - ISFG) [Bär et al, 1997]. Локус амелогенина не является STR-маркером, однако продукты амплификации этого локуса для хромосом X и Y различаются по длине.

1.2 Компоненты набора и состав

1.	Стрипы с реакционными смесями 8 x 0.2 мл	192 пробирки, 24 стрипа
2.	Раствор активатора	1 пробирка, 1.0 мл
3.	Деионизованная вода	2 пробирки, 1.7 мл
4.	Контрольная ДНК МК1	1 пробирка, 40 нанесений
5.	Размерный стандарт S550	2 пробирки, 120 нанесений
6.	Аллельная лестница	1 пробирка, 50 нанесений

Стрипы с реакционными смесями представляют собой реакционные пробирки объемом 0.2 мл, объединенные в стрипы по 8 шт и предназначены для проведения в них полимеразной цепной реакции. На дне пробирок содержатся все лиофилизированные компоненты полимеразной цепной реакции включая Taq-полимеразу, смесь дНТФ, реакционный буфер, праймерную смесь. Наборы могут также комплектоваться реакционными смесями, аликвотированными в реакционных 96-луночных планшетах (кат ном. СР-192Р)

Раствор активатора используется для разведения лиофилизированной реакционной смеси. Содержит буферный раствор и ионы магния Mg^{2+} в качестве активатора полимеразной цепной реакции.

Деионизированная вода предназначена для разведения компонентов набора и доведения реакций до рабочего объема.

Контрольная ДНК МК1 представляет собой 20 нг высокомолекулярной лиофилизированной геномной ДНК мужчины с известным генотипом по всем исследуемым локусам (Рис. 2). Предназначена для контроля этапов амплификации, электрофореза и анализа данных. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует разведения водой (п. 2.1).

Размерный стандарт S550 представляет собой лиофилизированную смесь флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК разной длины, меченых спектральным аналогом LIZ, детектируемым в канале *Orange*. Размерный стандарт S550 содержит 26 фрагментов ДНК разной длины (н.п.): 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500, 550. Размерный стандарт S550 используется на этапе капиллярного электрофореза, вносится в каждый капилляр одновременно с исследуемым образцом и служит опорным внутренним стандартом для построения кривой подвижности амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Благодаря высокой плотности фрагментов размерного стандарта S550 обеспечивается высокая точность и воспроизводимость определения длины амплифицированных фрагментов исследуемого образца. Перед использованием требует добавления воды (п. 2.2).

Аллельная лестница представляет собой лиофилизированную смесь флуоресцентно-меченных амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих всем аллельным вариантам исследуемых локусов, встречающимся с частотой более 1%. Аллельная лестница используется на этапе капиллярного электрофореза, анализируется параллельно с каждой серией образцов для идентификации аллельных вариантов исследуемых локусов. Поставляется в лиофилизированном виде. Перед использованием требует добавления воды (п. 2.3). Аллельная лестница содержит ПЦР-продукты и при несоблюдении мер предосторожности может быть источником контаминации остальных реагентов. Сразу после получения набора рекомендуется извлечь аллельную лестницу из общей упаковки и хранить отдельно от остальных компонентов в темноте в зоне для работы с ПЦР-продуктами.

1.3 Условия хранения

Все компоненты за исключением раствора активатора и деионизированной воды, поставляются в сухом виде. В связи с этим при транспортировке не требуется соблюдение специального температурного режима. Флуоресцентно меченные праймеры, размерный стандарт S550 и аллельная лестница чувствительны к воздействию света и должны храниться в темном месте.

Контрольная ДНК, аллельная лестница и размерный стандарт после разведения лиофилизированных компонентов водой, могут храниться при +2 - +8°C в течение 1 месяца. Для более длительного хранения рекомендуется заморозка при -15°C - -25°C.

Сразу после получения набора необходимо извлечь комплект для электрофореза и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР продуктами в темном месте при температуре +2– +8 °C. После разведения водой готовые растворы допускается хранить при температуре +2 – +8°C в течение месяца. Длительное хранение готовых растворов рекомендовано при температуре от -15°C до -25°C.

1.4 Основные характеристики набора

Количество одновременно анализируемых маркеров – 20
Список одновременно анализируемых локусов: D3S1358, TH01, D12S391, D1S1656, D10S1248, D22S1045, D2S441, D7S820, D13S317, FGA, TPOX, D18S51, D16S539, D8S1179, CSF1PO, D5S818, VWA, D21S11, SE33, Амелогенин
Количество флуоресцентных меток, используемых в наборе – 5
Оптимальное количество вносимой ДНК: 0,2–0,5 нг
Чувствительность: 100 пг
Дискриминирующий потенциал набора: менее 1 из 10^{21}

1.5 Гарантии качества

Качество каждого компонента набора проверено и контролируется в процессе производства. Каждый выпущенный лот лиофилизированных реагентов регулярно проверяется на соответствие заявленным характеристикам в течение 18 месяцев. В случае возникновения вопросов относительно качества набора COrDIS Plus, просим незамедлительно связаться с ООО “ГОРДИЗ”.

1.6 Сопутствующие материалы

Необходимые материалы, не входящие в набор:

Спектральный калибратор CS5 (ООО “ГОРДИЗ”).
Бины и панели для GeneMapper™ (ООО “ГОРДИЗ”, предоставляются бесплатно по запросу).

Материалы, поставляемые другими фирмами

Реагент	Производитель	Каталожный номер
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems	(P/N 4311320)
10 x Genetic Analyzer Buffer	Applied Biosystems	(P/N 402824)
Polymer (POP-4)	Applied Biosystems	(P/N 402838)

2. РАЗВЕДЕНИЕ СУХИХ КОМПОНЕНТОВ

2.1 Контрольная ДНК

Добавить 40 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором в пробирку с сухой контрольной ДНК. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Для проведения ПЦР необходимо добавить 1 мкл контрольной ДНК в реакционную пробирку. Данный объем будет соответствовать 500 пг геномной ДНК. После разведения готовый раствор допускается хранить при температуре +2°С – +8 °С в течение 1 месяца. Длительное хранение готового раствора рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С.

2.2 Размерный стандарт S550

Сразу после получения набора необходимо извлечь комплект для электрофореза и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР продуктами в темном месте при температуре +2– +8 °С.

Перед использованием добавить 120 мкл деионизированной воды в пробирку с сухим размерным стандартом S550. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. После разведения готовый раствор допускается хранить при температуре +2– +8 °С в течение месяца. Длительное хранение готового раствора рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С. Для проведения капиллярного электрофореза добавить 1 мкл размерного стандарта S550 в каждую лунку планшета, содержащую формамид и ПЦР продукт.

Объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 может быть снижен до **0.3 мкл** для увеличения возможного количества инжекций. При этом для оптимизации уровня сигнала рекомендуется использовать 1 мкл размерного стандарта S550 для каждого исследуемого препарата. Дополнительный размерный стандарт S550 может быть заказан по каталожному номеру S550-10.

2.3 Аллельная лестница

Сразу после получения набора необходимо извлечь комплект для электрофореза и хранить отдельно в зоне для работы с ПЦР продуктами в темном месте при температуре +2– +8 °С.

Для получения рабочего раствора добавить в пробирку с сухой аллельной лестницей **50 мкл** деионизированной воды, поставляемой с набором. Тщательно перемешать на вортексе и собрать на дне пробирки центрифугированием в течение нескольких секунд. После разведения готовый раствор допускается хранить при температуре +2 – +8 °С в течение месяца. Длительное хранение готового раствора рекомендовано при температуре от -15°С до -25°С. Для проведения капиллярного электрофореза необходимо добавить 1 мкл аллельной лестницы в смесь формамида и размерного стандарта.

При недостаточной чувствительности генетического анализатора допускается увеличение объема вносимой в лунку аллельной лестницы **до 2 мкл.**

3. ПЦР АМПЛИФИКАЦИЯ

3.1 Постановка реакции

В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Активатора. Затем внести до 20 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0.2–1 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК – **0,5 нг**. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет **20 мкл**. При необходимости довести общий объем реакции до 25 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

Компоненты набора	**Объем на 1 реакцию**
Раствор активатора	5 мкл
Геномная ДНК (0.2 – 1 нг)	до 20 мкл
Деионизованная вода, до конечного объема	25 мкл

Необходимо учитывать, что в некоторых случаях при добавлении ДНК в объеме более 10 мкл возможно внесение избытка ингибирующих веществ в реакцию, что может приводить к снижению чувствительности. Тем не менее, набор COrDIS Plus обладает высокой устойчивостью к ингибиторам. В связи с этим, как правило, большие объемы раствора ДНК не вызывают трудностей. При разведении геномной ДНК водой важно помнить, что в деионизированной воде происходит постоянный гидролиз ДНК. Для длительного хранения рекомендуется разведение ДНК в буферах (pH> 7), содержащих небольшое количество ЭДТА (например, ТЕ с 0,1 mM ЭДТА). Высокая концентрация ЭДТА в растворе ДНК может быть причиной снижения эффективности реакции вследствие хелатирования ионов магния.

После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать до гомогенного состояния 5-8 кратным пипетированием, либо используя вортекс. При необходимости собрать раствор на дне пробирки коротким центрифугированием. Тщательное перемешивание необходимо для максимальной эффективности реакции.

С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один **положительный контроль** (1 мкл контрольной ДНК + 19 мкл деионизированной воды, поставляемой с набором) и один **отрицательный контроль** (20 мкл деионизированной воды вместо ДНК).

3.2 Условия амплификации

Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров. Важно соблюдение скорости нагрева **0,3°C/сек**. на этапе повышения с температуры с 59°C до 72°C. В связи с высокой сложностью амплификации с участием большого количества пар праймеров **данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции**.

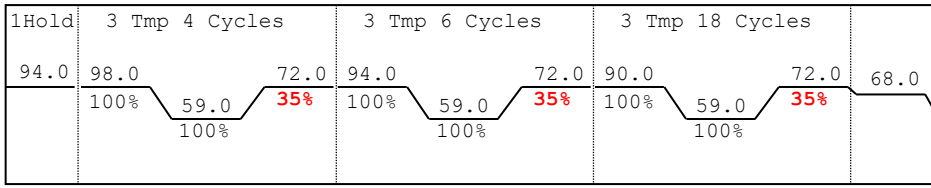
Параметры ПЦР:

94°C	3 мин	
98°C	30 сек	
59°C	120 сек	4 цикла
72°C*	90 сек	
94°C	30 сек	
59°C	120 сек	6 циклов
72°C*	90 сек	
90°C	30 сек	
59°C	120 сек	18 циклов
72°C*	75 сек	
68°C	10 мин	
15°C	∞	

* Рекомендуемая скорость нагрева с 59°C до 72°C - не более 0,3°C/1 сек.

В случае, если используемая модель амплификатора не позволяет точно устанавливать скорость нагрева, рекомендуется воспользоваться секундомером для подбора рекомендуемой скорости.

Например, в амплификаторах GeneAmp 9700 не предусмотрена возможность точного программирования скорости изменения температуры, но они позволяют ограничить скорость нагрева в процентном отношении. В приведенном ниже примере показаны подобранные значения скорости нагрева в процентном выражении для амплификатора GeneAmp 9700 с алюминиевым блоком в режиме эмуляции GeneAmp 9600.



При работе с низкокопийными количествами ДНК (<0,1 нг ДНК) можно повысить чувствительность реакции добавив 2-4 дополнительных цикла ПЦР. Не рекомендуется превышать 34 цикла. В этом случае возрастает опасность ошибки вследствие выпадения аллелей и дисбаланса гетерозигот.

После завершения программы ПЦР амплифицированные продукты можно хранить неделю при 4°C – 8°C в защищенном от света месте. В случае, если амплифицированные продукты необходимо хранить более недели, рекомендуется заморозка при -20°C.

4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130/3130XL

При работе с генетическим анализатором ABI PRISM, и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе GeneMapper™, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

Для корректной визуализации пяти флуоресцентных меток COrDIS Plus необходимо проведение спектральной калибровки для набора красителей “any5dyes” с использованием спектрального калибратора CS5.

4.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Plus на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным спектральным калибратором CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру: CS5). Спектральный калибратор содержит смесь 5-ти фрагментов разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти красители использованы в наборе для мечения ПЦР-продуктов и размерного стандарта S550. Для приготовления рабочего раствора спектрального калибратора CS5 добавить 50 мкл деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Затем тщательно перемешать раствор на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Готовый раствор можно хранить в темном месте при температуре +2 °C – +8 °C до 2 недель. Для длительного хранения рекомендуется заморозка при -15°C – -25°C. Следует избегать повторного размораживания. При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы для емкостей, содержащих буферный раствор и воду. Использование при проведении спектральной калибровки ранее использованных септ, может приводить к попаданию в область анализа ранее исследованных меченных ПЦР продуктов, и препятствовать успешному анализу спектрального калибратора.

Подготовка спектрального калибратора для калибровки (ABI 3130 /4 капилляра)

Hi-Di™ формамид	40 мкл
Раствор CS5	4 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01-D01 96-луночного планшета.
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Подготовка спектрального калибратора для калибровки (ABI 3130XL/16 капилляров)

Hi-DiTM формамид	160 мкл
Раствор CS5	16 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01- H02 96-луночного планшета.
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Спектральная калибровка

Шаг А – Создание Instrument Protocol для спектральной калибровки

Открыть **Protocol Manager** в программе **Data Collection Software**
Зайти во вкладку **Instrument Protocol** и выбрать **New** чтобы открыть **Protocol Editor**
Ввести следующие параметры в окне **Protocol Editor** (**Instrument Protocol**):

Параметр	**Значение**
Name	например, Spectral36_POP4_CS5
Type	SPECTRAL
Dye Set	any5dye
Polymer	POP4
Array Length	36
Chemistry	Matrix Standard
Run Module	Spect36_POP4_1

Выбрать **OK** и закрыть **Protocol Editor**

Шаг Б – Создание планшета

Перейти в **Plate Manager** программы **Data Collection Software** выбрать кнопку **New.** Откроется окно **Plate Dialog**.

Ввести следующие параметры в диалоговом окне New Plate:

Name	например, Spectral_any5_CS5
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well

Выбрать **OK**. Появится новая таблица **Plate Editor**
Ввести в позиции A01:

Sample Name	например, CS5
Priority	например, 100
Instrument Protocol	Spectral36_POP4_CS5

Выделить ячейку A01 целиком. В меню **Edit** выбрать команду **Fill Down Special**. Программа заполнит введенными значениями соответствующее количество ячеек для одной загрузки капилляров. Например, от A01 до A04 **(ABI 3130 / 4 капилляра)** или от A01 до H02 **(ABI 3130XL / 16 капилляров).**
Выбрать **OK** чтобы закончить создание планшета и выйти из **Plate Editor.**

Шаг C – Проведение спектральной калибровки

Перейти во вкладку **Run Scheduler** – **Plate View** и выбрать **Find All**. Выбрать заданное название созданного планшета (например, Spectral_any5_CS5). Связать выбранное название с установленным в прибор планшетом. Запустить прибор.

Шаг D – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Открыть **Instrument Status,** перейти во вкладку **Event Log**. В окне **Event Messages** отображается статус всех капилляров. Каждый капилляр должен иметь значение Q-value не ниже **0.8**. Высота пиков должна быть не менее 1.000 rfu, но ниже 5.000 rfu (оптимальный диапазон между 2000 и 4000 rfu).

Дополнительно в окне **Spectral Viewer** можно просмотреть флуоресцентный профиль калибровки для каждого капилляра. Калибровка должна быть успешной минимум для 3 из 4 капилляров (или для 12 из 16 капилляров, соответственно). При использовании CS5 в качестве спектрального калибратора, в окне профиля калибровки должна отражаться следующая последовательность пиков **синий-зеленый-желтый-красный-оранжевый**.

В случае успешной калибровки рекомендуется ее переименовать, присвоив более удобное название. Для этого нажать кнопку **Rename**, ввести новое название калибровки (например, **CS5_[дата]** и нажать **OK**. Нужно иметь виду, что для каждого набора виртуальных фильтров (**dye set**) последняя калибровка автоматически становится активной. Если вы планируете использовать результаты предыдущих калибровок, их необходимо активировать до запуска прибора.

4.2 Условия капиллярного электрофореза

Перед проведением первого анализа продуктов амплификации COrDIS Plus на генетическом анализаторе, необходимо создать соответствующий модуль **Run Module**. Для этого перейти в **Module Manager** программы **Data Collection Software** и нажать кнопку **New**. Откроется окно **Run Module Editor**. Создать модуль со следующими параметрами:

Параметр	**Значение**
Oven Temperature	60
Poly Fill Volume	4840
Current Stability	5
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	**1.2**
Injection Time	**10**

Voltage Number of Steps	40
Voltage Step Interval	15
Data Delay Time	1
Run Voltage	13.0
Run Time	**1700**

Нажать **Save As** и ввести удобное название для созданного модуля (например, COrDIS). Нажать **OK** и покинуть редактор модуля нажав **Close**.

4.3 Создание Instrument Protocol

Перейти в раздел **Protocol Manager** программы **Data Collection Software**. В окне **Instrument Protocol** нажать кнопку **New** чтобы открыть редактор протокола **Protocol Editor**.

Необходимо ввести следующие параметры:

Параметр	Значение
Name	Run36_COrDIS
Type	REGULAR
Run Module	COrDIS
Dye Set	Any5Dye

Нажать кнопку **OK** чтобы сохранить изменения и выйти из редактора протокола.

4.4 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамида и размерного стандарта S550 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на один образец
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инжекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы. Как минимум одна лунка при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку планшета. Затем внести в лунки по 1 мкл ПЦР-продукта или аллельной лестницы. При необходимости удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием.

Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C	2 мин
4°C	1 мин

Загрузить планшет с денатурированными образцами в прибор в соответствии с инструкцией пользователя ABI PRISM® Genetic Analyzer.

4.5 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM® проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую спектральную калибровку, Run Module, и Instrument Protocol.

Шаг A Создание планшета

Перед началом анализа необходимо создать **Plate** (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Перейти в **Plate Manager** программы **Data Collection Software** и нажать кнопку **New**. Появится диалоговое окно **Plate Dialog**. Ввести следующие параметры:

Параметр	Значение
Name	Например COrDIS_[*дата*]
Application	выбрать GeneMapper
Plate Type	96-Well

Нажать кнопку **OK**. Появится новая таблица **Plate Editor**.

Шаг B Заполнение таблицы

Параметр	Значение
Sample Name	Название образца
Priority	обычно 100 (очередность анализа по возрастанию)
Sample Type	Sample / Allelic Ladder / Positive Control / Neg. Control
Size Standard	S550
Panel	COrDIS
Analysis Method	Например, GORDIZ
User-defined 1-3	
SNP Set	
Results Group	Выбрать соответствующий **Results Group**
Instrument Protocol	Run36_POP4_CS5

Для удобства в первую очередь лучше ввести все названия образцов. Затем, для первого образца задать все необходимые параметры. Выделить курсором мыши все столбцы. В меню **Edit** выбрать пункт **Fill Down**. Программа заполнит значениями все выделенные ячейки. После этих действий редактировать столбец Sample Type, выбрав между значениями Allelic Ladder / Positive Control / Negative Control.

Шаг C Запуск прибора и информация о статусе прибора

Перейти в раздел **Run Schedule** и нажать на кнопку **Find All**. Найти в списке название созданного планшета, выделить его и связать нажатием мыши с изображением установленного в приборе планшета. Запустить анализ планшета.

Флуоресцентные профили образцов можно наблюдать в реальном времени в разделе **Capillaries Viewer** или **Cap/Array Viewer**. В случае возникновения системных ошибок информация о них появится в разделе Event **Log** (**Error Status**).

4.6 Оптимизация интенсивности сигналов

Для повышения интенсивности пиков возможно увеличение времени инжекции до 15 сек и/или увеличение вольтажа до 15 kV.

Возможно усиление сигнала с помощью очистки ПЦР-продукта от праймеров и солей. Количество размерного стандарта S550 в этом случае следует так же уменьшить.

При работе с некоторыми модификациями генетических анализаторов ABI 3130, оснащенных высокочувствительными флуоресцентными датчиками могут наблюдаться нежелательные эффекты, связанные с избыточным уровнем сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов на этапе анализа результатов электрофореза. Снижение избыточного уровня сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов может быть достигнуто снижением времени инжекции образцов до 3 сек и/или снижением вольтажа до 1.5 kV.

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3500/3500XL

При работе с генетическим анализатором ABI PRISM, и последующем анализе флуоресцентных профилей в программе GeneMapper™, необходимо следовать инструкциям пользователя от производителя оборудования.

5.1 Спектральная калибровка

Анализ продуктов амплификации COrDIS Plus на генетическом анализаторе возможен только после проведения калибровки с 5-ти цветным спектральным калибратором CS5 (не поставляется с набором, заказывается отдельно по каталожному номеру: CS5). Спектральный калибратор содержит смесь 5-ти фрагментов разной длины, меченных разными флуоресцентными красителями. Эти красители использованы в наборе для мечения ПЦР-продуктов и размерного стандарта S550. Для приготовления рабочего раствора спектрального калибратора CS5 добавить 50 мкл деионизированной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный CS5 и инкубировать при комнатной температуре 2 мин. Затем тщательно перемешать раствор на вортексе и собрать на дне пробирки коротким центрифугированием. Готовый раствор можно хранить в темном месте при температуре +2 °C – +8 °C до 2 недель. Для длительного хранения рекомендуется заморозка при -15°C – -25°C.

При проведении спектральной калибровки **настоятельно рекомендуется** использовать только чистые септы для емкостей, содержащих буферный раствор и воду. Использование при проведении спектральной калибровки ранее использованных септ, может приводить к попаданию в область анализа ранее исследованных меченных ПЦР продуктов, и препятствовать успешному анализу спектрального калибратора

Подготовка спектрального калибратора для калибровки (ABI 3500 /8 капилляров)

Hi-Di™ формамид	80 мкл
Раствор CS5	8 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01-H01 96-луночного планшета.
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Подготовка спектрального калибратора для калибровки (ABI 3500XL/ 24 капилляра)

Hi-DiTM формамид	240 мкл
Раствор CS5	24 мкл

Добавить по 10 мкл смеси в лунки A01- H03 96-луночного планшета.
При необходимости удалить пузыри со дна лунок центрифугированием.

Спектральная калибровка

Шаг А – Создание Dye Set для спектральной калибровки

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software.** В разделе **Analyze,** выбрать вкладку **Dye Sets.** В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Dye Set). В появившемся окне указать параметры нового Dye Set:

Dye Set Name	CS5
Chemistry	Matrix standard
Dye Set Template	G5 Template
Arrange Dyes	оставить без изменений
Parameters:	
Matrix Condition Number	20.0
Minimal Quality Score	0.8

Нажать кнопку **Save**. Новый Dye Set (CS5) появится в списке.

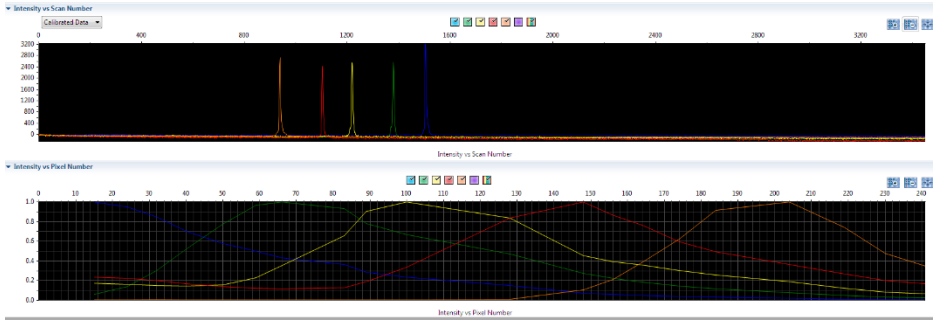
Шаг B – Проведение спектральной калибровки

Перейти в раздел **Maintenance** в программе **Data Collection Software.** В разделе **Calibrate,** выбрать вкладку **Spectral Calibration.** В открывшемся окне выбрать количество лунок в используемом планшете (**Number of Wells**) и позицию планшета в приборе (**Plate Position**). В пункте **Chemistry Standard** выбрать Matrix standard. В пункте **Dye Set** выбрать CS5. Запустить процесс калибровки нажав кнопку **Start Run**.

Шаг C – Оценка результатов спектральной калибровки

После завершения работы прибора проверить статус каждого капилляра (pass или fail). Высота пиков должна быть не менее 500 rfu, но ниже 10.000 rfu (оптимальный диапазон между 1000 и 5000 rfu).

Калибровка должна быть успешной минимум для 6 из 8 капилляров (или для 18 из 24 капилляров, соответственно). При использовании CS5 в качестве спектрального калибратора, в окне профиля калибровки (Intensity vs Pixel Number) должна отражаться следующая последовательность пиков **синий-зеленый-желтый-красный-оранжевый**.

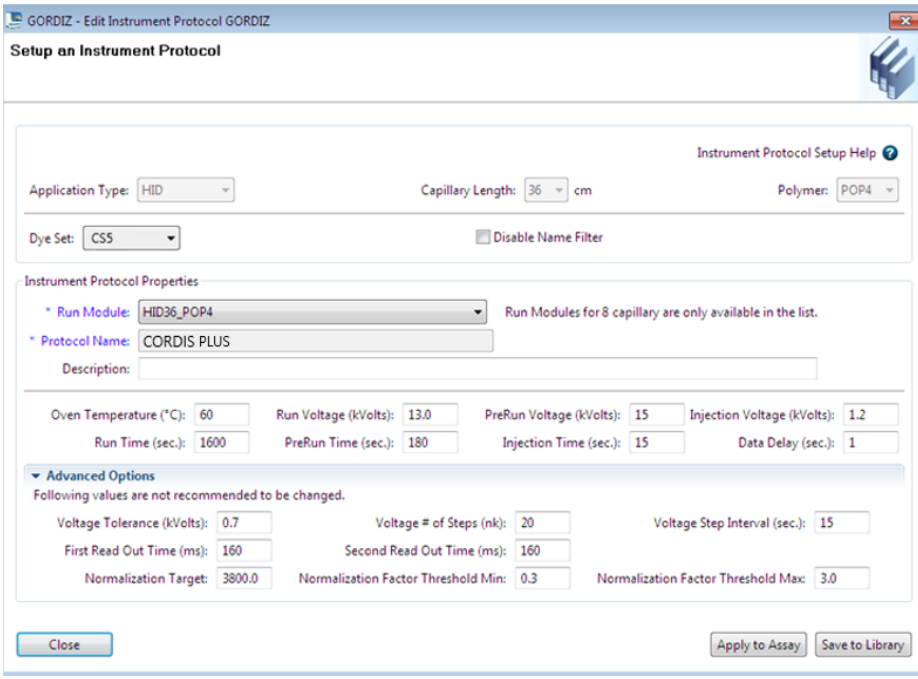


В случае успешной калибровки сохранить полученные результаты, нажав кнопку **Accept**.

5.2 Создание Instrument Protocol

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software.** В разделе **Analyze,** выбрать вкладку **Instrument Protocols.** В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Instrument Protocol). В появившемся окне указать параметры нового Instrument Protocol:

Application Type	HID
Dye Set	CS5
Run Module	например “HID36_POP4” (выбрать протокол соответствующий параметрам системы)
Protocol Name	COrDIS Plus



Рекомендуемые параметры электрофореза для генетического анализатора ABI 3500:

Параметр	**Значение**
Oven Temperature	60
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	1.2
Injection Time	10
Data Delay Time	1
Run Voltage	13.0
Run Time	1600

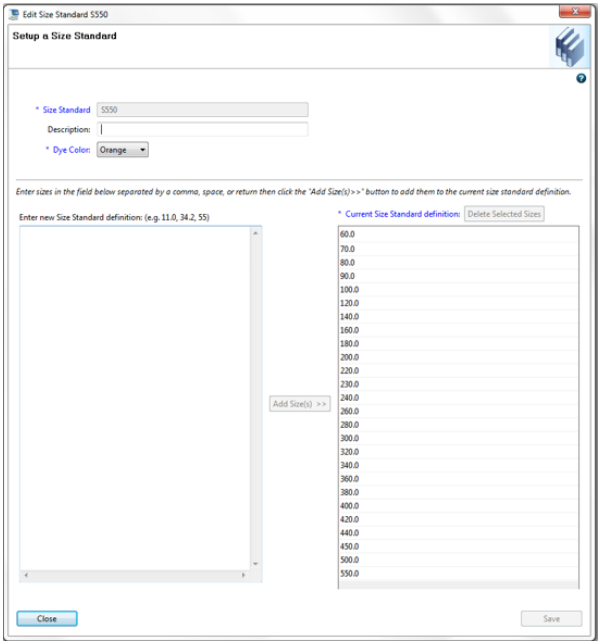
Нажать кнопку **Save**.

В зависимости от состояния используемого прибора, параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала. Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореза является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все

фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время фореза в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

5.3 Создание Size Standard

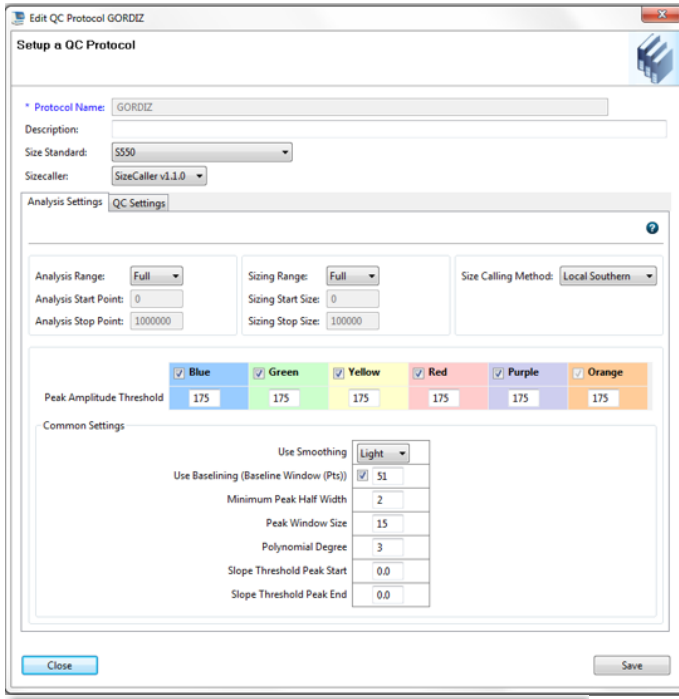
Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software.** В разделе **Analyze**, выбрать вкладку **Size Standards**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового **Size Standard**). В появившемся окне указать параметры нового **Size Standard**. Размерный стандарт S550 содержит 26 фрагментов ДНК разной длины (н.п.): 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500, 550.

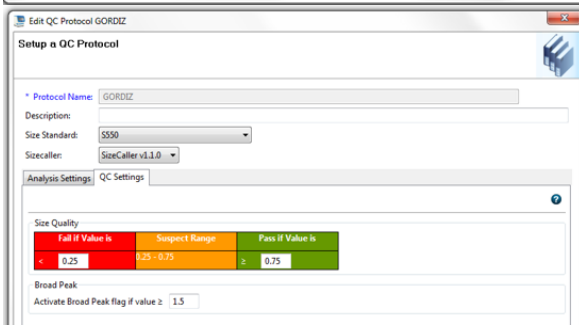


Нажать кнопку **Save**.

5.4 Создание QC Protocol

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software.** В разделе **Analyze**, выбрать вкладку **QC Protocols**. В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового **QC Protocol**). В появившемся окне указать параметры нового **QC Protocol**:



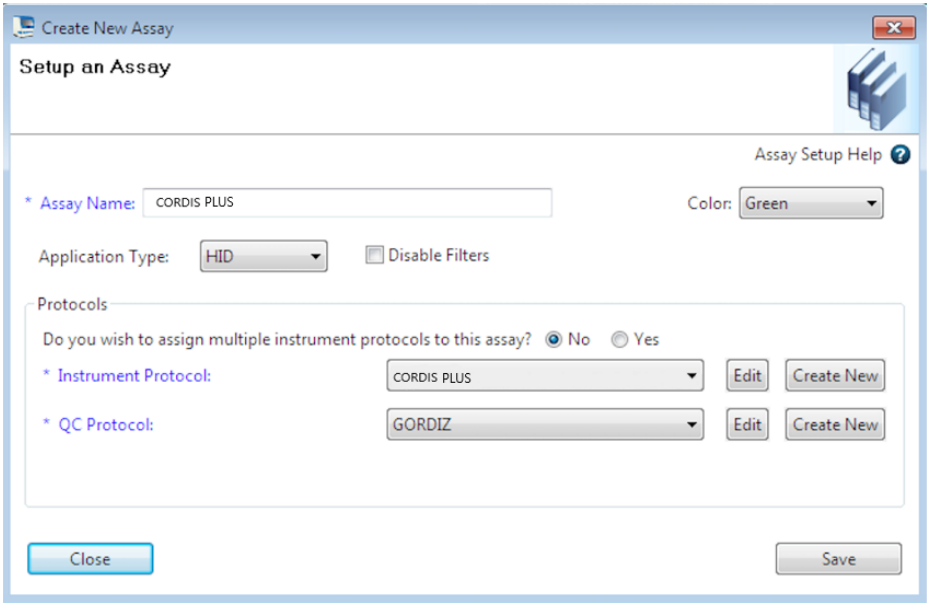


Нажать кнопку **Save**.

5.5 Создание Assay

Перейти в раздел **Library** в программе **Data Collection Software.** В разделе **Manage,** выбрать вкладку **Assays.** В открывшемся меню нажать кнопку **Create** (откроется диалоговое окно создания нового Assay). В появившемся окне указать параметры нового Assay:

Assay Name COrDIS Plus
Application Type HID
Instrument Protocol COrDIS Plus



Нажать кнопку **Save**.

5.6 Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамида и размерного стандарта S550 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на один образец
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инжекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы. Как минимум одна лунка при анализе каждой серии образцов должна содержать аллельную лестницу.

После перемешивания добавить по 10 мкл смеси в каждую лунку планшета. Затем внести в лунки по 1 мкл ПЦР-продукта или аллельной лестницы. При необходимости удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием.

Накрыть планшет резиновым ковриком и провести температурную денатурацию по схеме:

95°C	2 мин
4°C	1 мин

Загрузить планшет с денатурированными образцами в прибор в соответствии с инструкцией пользователя ABI PRISM® Genetic Analyzer.

При необходимости количество инжекций аллельной лестницы может быть увеличено путем снижения объема вносимой в лунку аллельной лестницы до 0.5 мкл (без потери качества анализа). Объем вносимого в лунку размерного стандарта S550 также может быть снижен до 0.5 мкл для увеличения возможного количества инжекций. При этом для оптимизации уровня сигнала рекомендуется использовать 1 мкл размерного стандарта S550 для каждого исследуемого препарата. Дополнительный размерный стандарт S550 может быть заказан по каталожному номеру S-550.

5.7 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM® проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую спектральную калибровку, Instrument Protocol и Assay.

Шаг А – Создание планшета

Перед началом анализа необходимо создать **Plate** (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Для этого необходимо перейти в меню **Create New Plate** программы **Data Collection Software**. Появится диалоговое окно, в котором необходимо указать параметры нового планшета:

Name	Например CORDIS_[*дата*]
Plate Type	Fragment

Нажать кнопку **OK**. Появится новая таблица со схемой исследуемого планшета.

Шаг В – Заполнение таблицы

Для всех анализируемых лунок планшета необходимо указать:

Sample name	имя объекта
Sample type	тип образца
Assay	CORDIS Plus
Filename convention	структура имени файла
Results group	параметры сохранения файлов

Шаг C – Запуск прибора и информация о статусе прибора

После создания схемы расположения образцов на планшете, нажмите на кнопку **Link Plate for Run.** В открывшемся окне указать положение планшета в приборе и запустить электрофорез нажатием кнопки **Start Run.**

5.8 Оптимизация интенсивности сигнала

Для повышения интенсивности сигнала возможно увеличение времени инжекции. Усиление сигнала также возможно с помощью очистки ПЦР-продукта от праймеров и солей. Количество размерного стандарта в этом случае следует так же уменьшить.

При работе с высокочувствительными генетическими анализаторами ABI 3500 могут наблюдаться нежелательные эффекты, связанные с избыточным уровнем сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов на этапе анализа результатов электрофореза. В этом случае рекомендуется снизить количество вносимого в реакцию генетического материала до рекомендованных 0,5 нг геномной ДНК. Дополнительно, снижение избыточного уровня сигнала флуоресценции амплифицированных продуктов может быть достигнуто снижением времени инжекции образцов до 5–7 сек.

6. АНАЛИЗ ДАННЫХ

6.1 Настройка программного обеспечения GeneMapper

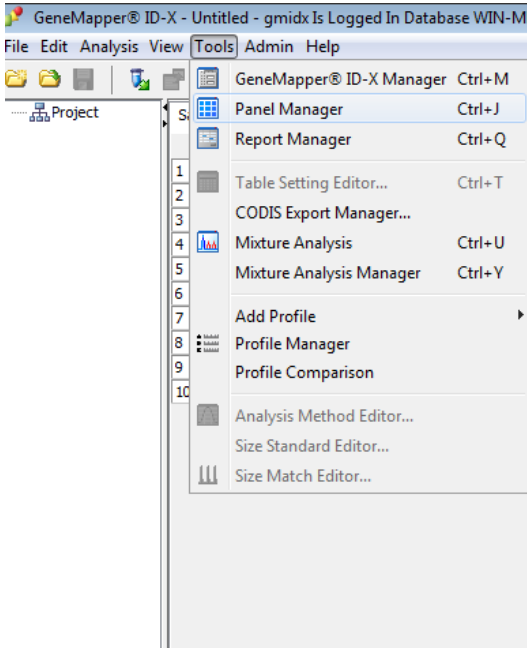
Полученные данные могут быть проанализированы с использованием программного обеспечения GeneMapper ID и GeneMapper ID-X.

Программное обеспечение GeneMapper требует предварительной настройки параметров анализа. Параметры анализа для наборов COrDIS могут быть импортированы в программу из файлов настроек, предоставляемых производителем по запросу.

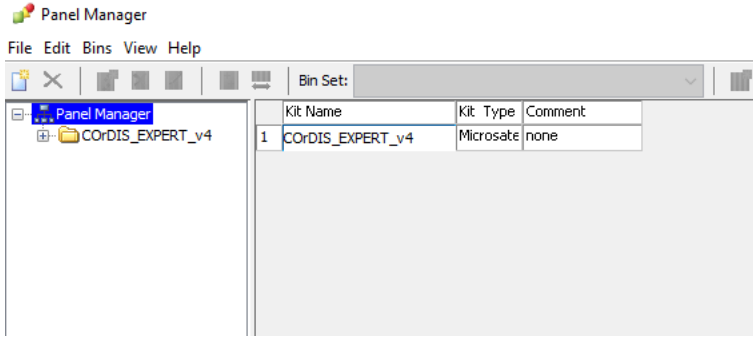
Для анализа результатов электрофореза с использованием программного обеспечения GeneMapper необходимо произвести следующие действия:

1) Произвести импорт файлов панелей и бинов.

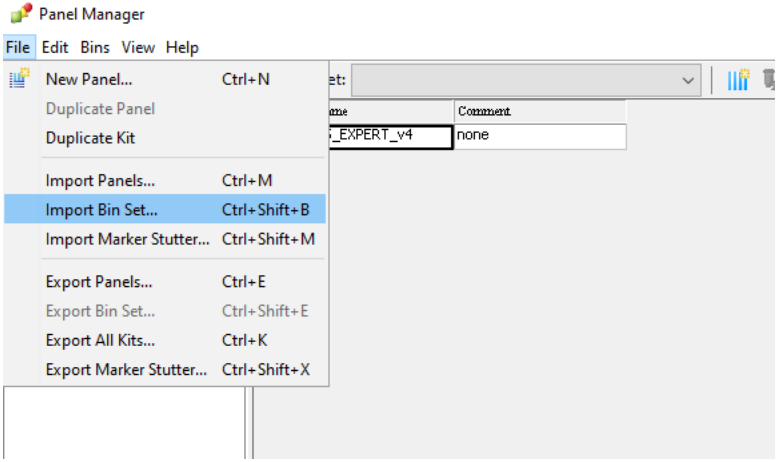
Выбрать пункт меню Tools-> Panel Manager.



В левом верхнем сегменте открывшегося окна установить курсор на позицию Panel Manager.



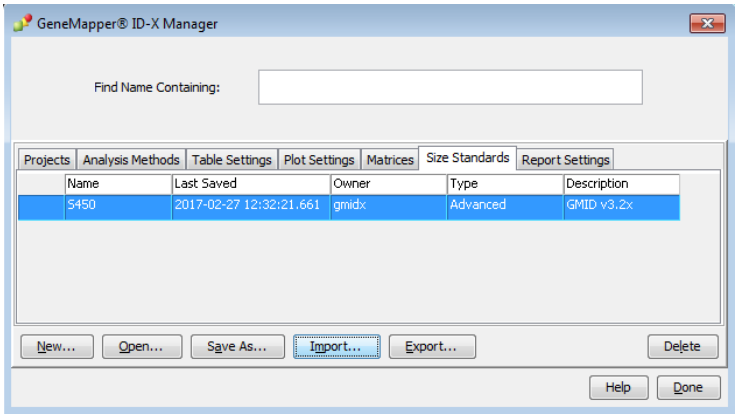
Затем в меню выбрать File-> Import panels.



В открывшемся окне найти и выбрать файл с панелями (например, файл Plus _Panels). Загрузить нажатием кнопки Import. В левом верхнем сегменте окна выбрать загруженную панель (Например, Plus), затем в меню выбрать File-> Import bin set. В открывшемся окне найти и выбрать файл с бинами (Например, файл Plus _bins). Загрузить нажатием кнопки Import. Нажать кнопки Apply и OK.

2) Произвести импорт настроек размерного стандарта.

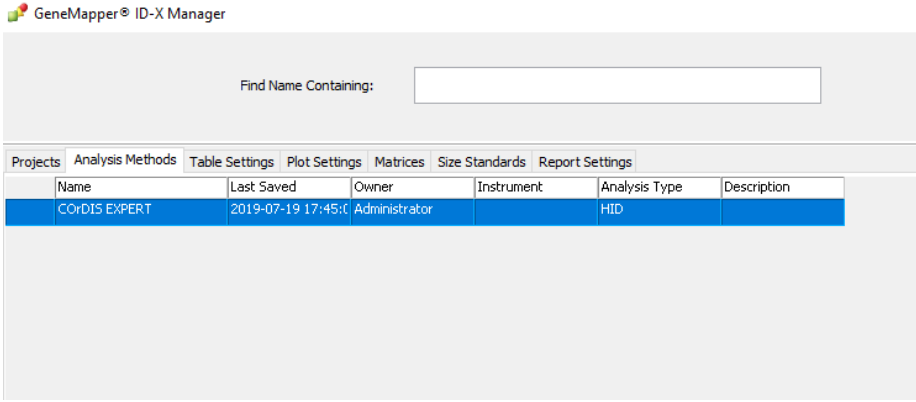
Выбрать пункт меню Tools> GeneMapper Manager. В открывшемся окне выбрать вкладку Size Standards



Загрузить файл настроек размерного стандарта нажатием кнопки Import. Нажать кнопку Done.

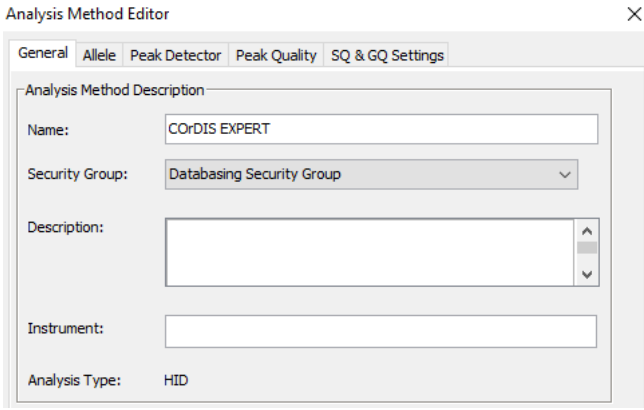
3) Создать новый метод анализа.

Выбрать пункт меню Tools -> GeneMapper Manager. В открывшемся окне выбрать вкладку Analysis Methods.

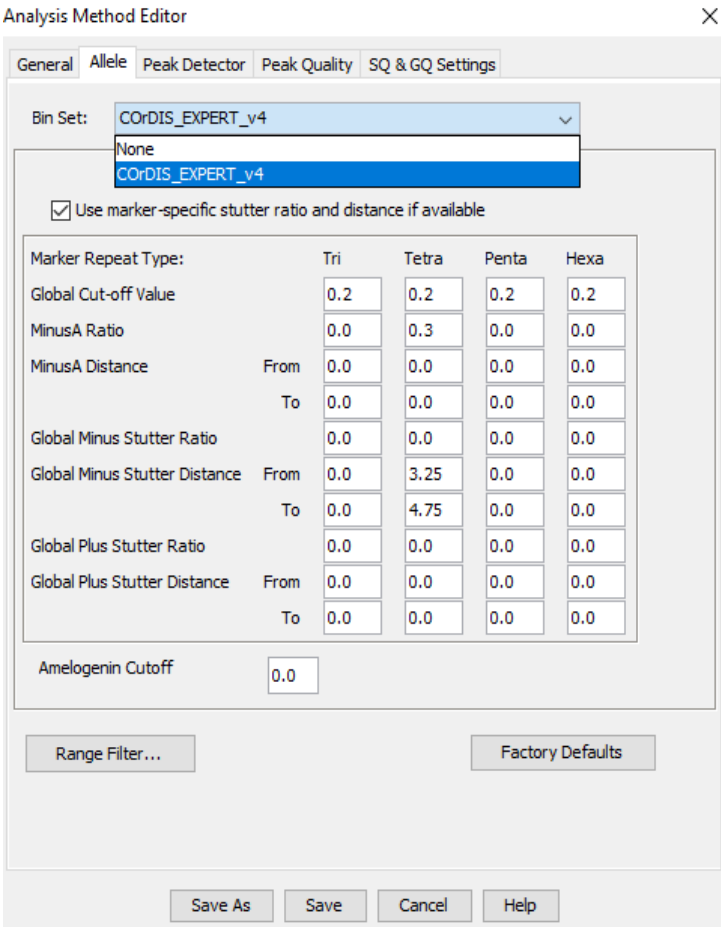


Создать новый метод анализа нажатием кнопки New.

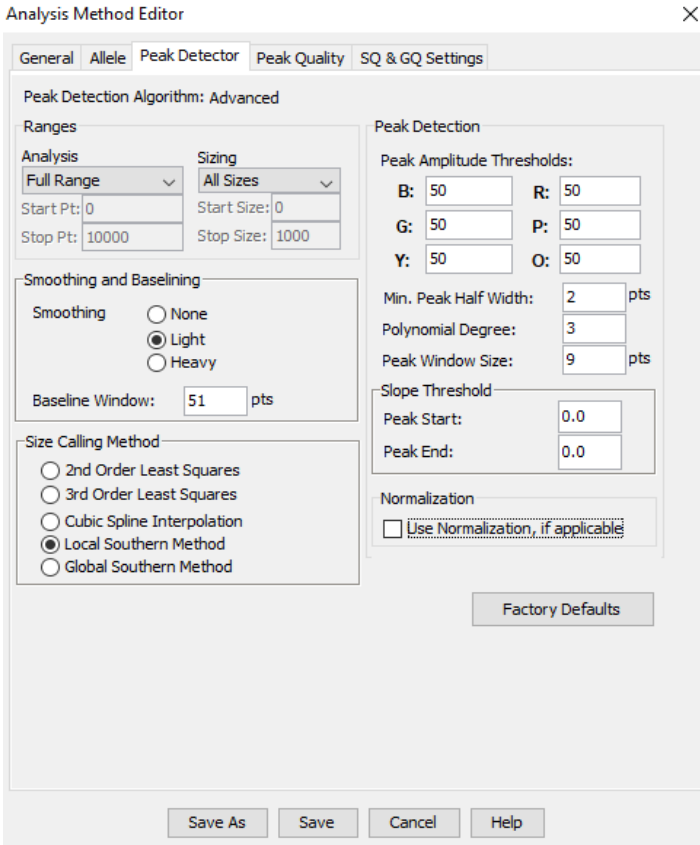
Присвоить имя новому методу анализа. Например, COrDIS Plus.



Во вкладке Allele выбрать соответствующий набор бинов.



Провести настройку параметров анализа во вкладке Peak Detector: установить значение параметра Peak Window Size равным 9, отключить нормализацию сигнала (Use Normalization, if applicable).



Сохранить изменения.

6.2 Размерный стандарт S550

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов размерного стандарта S550 в канале детекции *Orange*. Обозначения 26 фрагментов ДНК приводятся в соответствии с их размером: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500, 550.

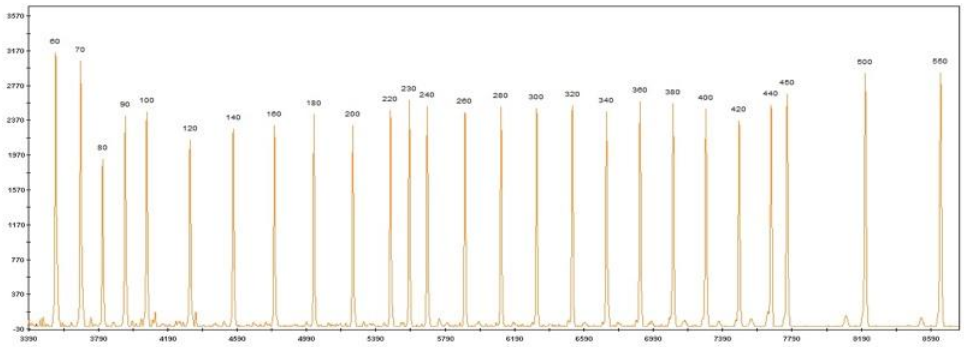


Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550. Размеры фрагментов.

6.3 Диапазоны размеров аллелей STR маркеров

Локус	Диапазон аллелей	Диапазон длин фрагментов	Аллели МК-1	Цвет метки
Amelogenin X	X	81	X	синий
Amelogenin Y	Y	84	Y	синий
D3S1358	8 – 21	93 - 147	15/17	синий
TH01	3 - 14	152 - 196	6/9.3	синий
D12S391	13 - 28	204 - 264	21/23	синий
D1S1656	9 - 21	275 - 324	14/17.3	синий
D10S1248	8 - 21	338 - 390	15/15	синий
D22S1045	8 - 19	400 - 450	15/15	синий
D2S441	8 - 19	84 - 134	14/14	зеленый
D7S820	5 - 16	137 - 181	10/12	зеленый
D13S317	5 - 17	188 - 236	11/11	зеленый
FGA	12.2 – 51.2	238 - 391	20/22.2	зеленый
TPOX	4 - 16	66 - 113	8/9	желтый
D18S51	7 - 27	124 - 200	14/16	желтый
D16S539	4 - 16	208 - 356	12/13	желтый
D8S1179	7 - 20	262 - 214	10/10	желтый
CSF1PO	5 - 16	317 - 361	9/11	желтый
D5S818	6 - 18	369 - 413	9/12	желтый
VWA	10 - 25	94 - 155	16/18	красный
D21S11	24 – 41.2	158 - 228	30.2/30.2	красный
SE33	4.2 – 50.2	233 - 403	24.2/29.2	красный

Таблица 2 Диапазон длин аллелей.

6.4 Амплификация контрольной ДНК

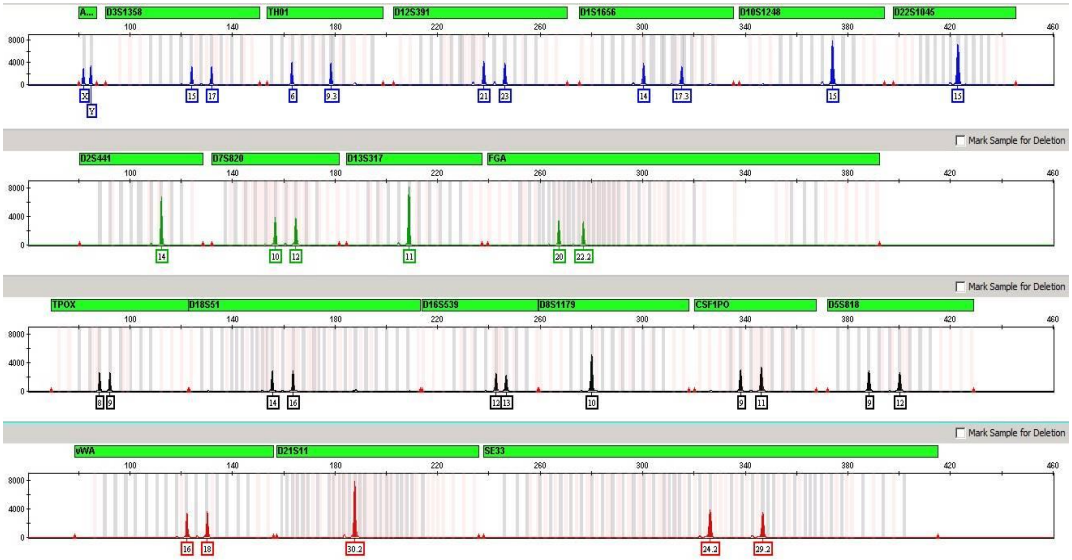


Рисунок 2 Контрольная ДНК МК1 **COrDIS**.

6.5 Аллельная лестница

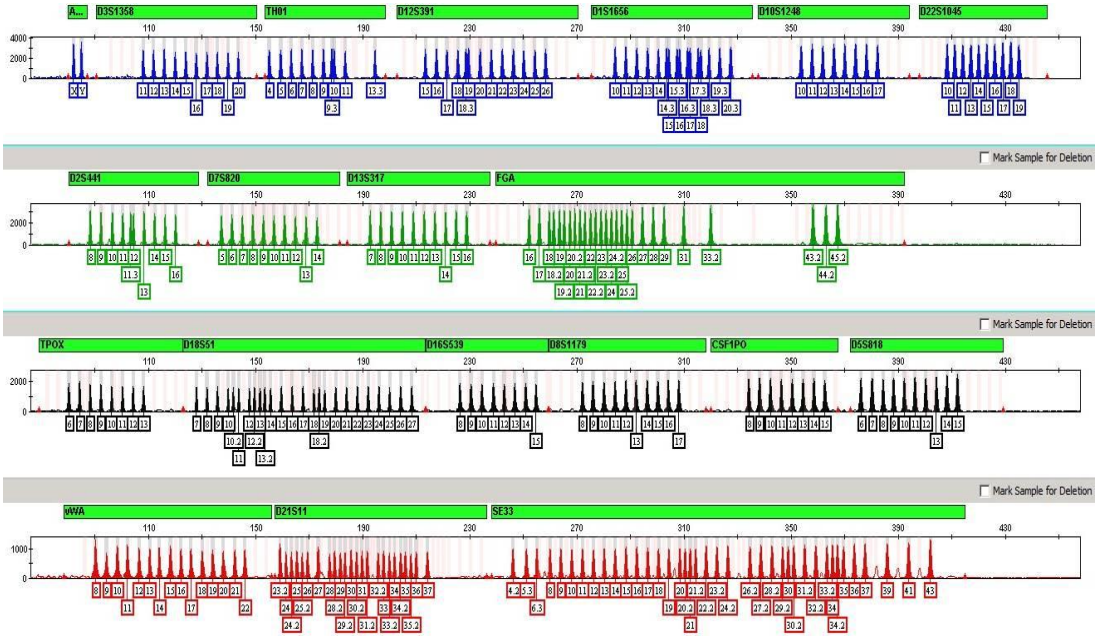


Рисунок 3. Аллельная лестница **COrDIS Plus**.

7. ИНФОРМАЦИЯ О ФИРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Производитель: ООО «ГОРДИЗ»
Адрес: 121205 г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой Бульвар, д.42, стр. 1, эт.1 пом.337
Телефон/факс: +7 (499) 670-40-41
Домашняя страница: www.gordiz.ru
e-mail: gordiz@gordiz.ru